

S-Pi-typning (S-alfa-1-Antitrypsin_ klassning av fenotyp) med isoelektrisk fokusering (NPU10618)Gäller för
Klinisk kemi

MA

S-Pi-typning (S-alfa-1-Antitrypsin, klassning av fenotyp) med isoelektrisk fokusering (NPU10618)**Bakgrund, indikation och tolkning**

Proteinasinhibitorn (Pi) α_1 -antitrypsin (AAT) uppvisar en uttalad mikroheterogenitet i laddning som förklaras av variationer i både peptid- och oligosackariddelen. Mer än 75 kända genetiska varianter bidrar till heterogeniteten i peptiddelen. Genom separation enligt isoelektrisk punkt över ett mycket snävt pH-område kan genetiska varianter som ger upphov till förändrad laddning hos antitrypsin-molekylen detekteras.

De två vanligaste genetiska varianterna som är kopplad till sänkt halt av antitrypsin i plasma och den ärftliga sjukdomen antitrypsinbrist är Z-allelen respektive S-allelen. Båda har sitt ursprung i punktmutationer som ger upphov till ett aminosyraskifte men i olika delar av genen. Aminosyraskiftet i det uttryckta Z- respektive S-proteinet är båda påvisbara med Pi-typning.

Det finns flera alleler som anses som normala. De vanligast förekommande av dem uttrycker antitrypsin med en mobilitet som betecknas M och således betraktas Pi M som en normal fenotyp.

Det förekommer ovanliga alleler som är kopplade till antitrypsinbrist och som uttrycker ett protein med förändrade egenskaper där mobilitet vid den isoelektriska fokuseringen sammanfaller med det normala proteinets mobilitet (M).

Sänkt halt av AAT i serum predisponerar för lungemfysem bland annat p.g.a. bristande skydd mot leukocytelastas i alveolerna. Pi Z proteinet (och vissa andra sällsynta varianter) medför risk för leversjukdom, både hos nyfödda och hos vuxna, orsakad av en koncentration- och temperaturberoende polymerisering av proteinet.

Pi-typning rekommenderas då man önskar ta reda på huruvida en patient bär på anlag som kan kopplas till antitrypsinbrist. Indikationer för analysen kan t ex vara kliniska symptom som inger misstanke om antitrypsinbrist (ex. lungsjukdom, leversjukdom, panniculit) eller sänkt antitrypsinhalt i plasma. En annan relativt vanlig indikation är som ett led i en släktutredning för antitrypsinbrist. En antitrypsinhalt inom referensområdet utesluter inte att patienten bär på anlag för antitrypsinbrist [1-4]. För de som vill läsa mer hänvisas i första hand till en sammanställning av de vanligaste Pi-typerna och deras koppling till sjukdom som publicerades av Janciauskiene et. al i Läkartidningen nr 48 (2007) [5]. En sammanfattning med fokus på ärftlig antitrypsinbrist och leversjukdom återfinns i dokumentet "Utredning av patologiska leverprover, Bakgrundsdokumentation, 2012-06-25" sammanställt av Svensk Gastroente-

S-Pi-typning (S-alfa-1-Antitrypsin_ klassning av fenotyp) med isoelektrisk fokusering (NPU10618)Gäller för
Klinisk kemi

MA

rologisk Förenings arbetsgrupp [6]. Önskar man ta del av publikationer som rör uppföljning av patienter med ärftlig antitrypsinbrist kan t.ex. "The Clinical profile of Subjects Included in the Swedish National Register on Individuals with Severe Alpha 1-Antitrypsin deficiency" [7], "Clinical course and prognosis of never-smokers with severe alpha-1-antitrypsin deficiency (PiZZ) [8] och "The Swedish α_1 -Antitrypsin Screening Study: Health Status and Lung and Liver Function at age 34" [9] vara av värde.

Pi-typning bör alltid ingå som ett led i en antitrypsinbristutredning. De vanliga allelerna M, S och Z identifieras på ett tillförlitligt sätt med Pi-typning. Ibland kan Pi-typningen vara inkonklusiv eller inge misstanke om en mer ovanlig antitrypsinvariant. I dessa fall är ofta en kompletterande DNA analys av värde.

Analysprincip

Pi-typ (α_1 -antitrypsin fenotyp) bestäms med hjälp av isoelektrisk fokusering av individens serum (plasma). Genom cysteinreduktion av α_1 -antitrypsin ökas upplösningen av de katodala α_1 -antitrypsinfraktionerna, vilket är nödvändigt för en säker typning, framför allt vad gäller MZ- och SZ-fenotyperna.

För separering av α_1 -antitrypsinfraktionen användes isoelektrofokusering i 5 % polyakrylamidgel. Polyakrylamidgelen framställs genom polymerisering av akrylamid i närvaro av N, N¹-metylenbisakrylamid som tvärbindande komponent. Ammoniumpersulfat och N, N, N, N¹-tetrametyletylen-diamin (TEMED) användes som katalysatorer. Två lösningar med individuella amfolyter inom pH-intervallet 4,2 - 4,9 och 3,0 - 10,0 tillsätts gelblandningen.

Polyakrylamidgelen gjuts på plastfilm mellan glasplattor.

Cysteinreducerat serum (plasma) sätts på provappliceringspapper, som placerats på polyakrylamidgelen. De olika α_1 -antitrypsinfraktionerna fokuseras till ett läge, som motsvarar deras respektive isoelektriska punkter. Efter avslutad elektrofores fixeras proteinerna och färgas med Coomassie R 250. Överskottsfärgen tvättas bort, gelplattan får "torka" och täcks därefter med plastfilm.

Referensintervall

Ingen kvantitativ analys. Referensintervall saknas.

Metodkaraktistika

Interferenser och felkällor

Inga kända.

Mätområde

S-Pi-typning (S-alfa-1-Antitrypsin_ klassning av fenotyp) med isoelektrisk fokusering (NPU10618)

Gäller för
Klinisk kemi

MA

Ingen kvantitativ analys. Mätområde saknas.

S-Pi-typning (S-alfa-1-Antitrypsin_ klassning av fenotyp) med isoelektrisk fokusering (NPU10618)

Detektionsgräns

Ingen kvantitativ analys. Detektionsgräns saknas.

Mätosäkerhet

Ingen kvantitativ analys. Mätosäkerhet kan ej fastställas.

Spårbarhet

Ej relevant.

Ackreditering

Metoden är ackrediterad.

Referenser

1. Nilsson-Ehle P, red. Laurells Klinisk kemi i praktisk medicin. Lund: Studentlitteratur 2003, 8:e upplagan sid 143-144..
2. Crystal, RG (ed). Alpha 1-antitrypsin Deficiency: Biology, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Therapy. Lung Biology in Health and Disease Volume 88; New York, NY: Marcell Dekker, Inc. 1996.
3. Pierce JA, Jeppsson JO, Laurell CB. Alpha-1 Antitrypsin phenotypes determined by isoelectric focusing of the cysteine-antitrypsin mixed disulfide in serum. Anal Biochem. 1976;74:227-241.
4. Jeppsson, JO and Franzén B, Typing of genetic variants of alpha 1-antitrypsin by electrofocusing. Clin Chem 1982;28: 219-225.
5. Janciauskiene et. al, Läkartidningen nr 48 (2007).
6. Utredning av patologiska leverprover, Bakgrundsdokumentation, 2012-06-25, http://www.svenskgastroenterologi.se/sites/default/files/pagefiles/Utredning_av_patologiska_leverprover_Bakgrundsdokument.pdf [6].
7. Piitulainen E and Tanash H. The Clinical profile of Subjects Included in the Swedish National Register on Individuals with Severe Alpha 1-Antitrypsin deficiency. COPD. 2015 May;12 Suppl 1:36-41.
8. Tanash HA et al. Clinical course and prognosis of never-smokers with severe alpha-1-antitrypsin deficiency (PiZZ). Thorax. 2008 Dec;63(12):1091-5.
9. Tanash HA et al. The Swedish α 1-Antitrypsin Screening Study: Health Status and Lung and Liver Function at Age 34. Ann Am Thorac Soc. 2015 Jun;12(6):807-12.